

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/CN04/001362

International filing date: 26 November 2004 (26.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: CN
Number: 200410000851.2
Filing date: 05 January 2004 (05.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 05 April 2005 (05.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2004. 01. 05

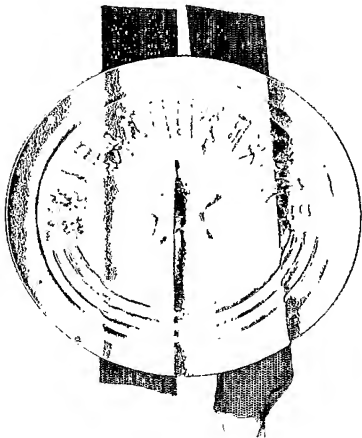
申 请 号： 2004100008512

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 一种中药有效成分的氨基酸序列获得方法及其所确定的
具体氨基酸序列

申 请 人： 吴文言

发明人或设计人： 吴文言



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 荣 川

2005 年 2 月 18 日

权 利 要 求 书

1、一种中药有效成分的氨基酸序列获得方法，其特征在于：将含有中药有效成分的功能活性部位的多肽/蛋白质进行分离纯化，利用药效学分析方法确证其药效后，进行氨基酸序列测定；然后，从动植物的功能活性部位或组织中制备 cDNA 文库，利用 PCR 技术从 cDNA 文库或直接从 mRNA 中获得编码中药活性多肽/蛋白的基因；从而得到活性多肽/蛋白的氨基酸序列。

2、根据权利要求 1 所述的中药有效成分的氨基酸序列获得方法，其特征在于：中药有效成分的基因是麝香多肽或蛋白的编码基因。

3、一种权利要求 2 所述的中药有效成分的氨基酸序列获得方法所确定的具体氨基酸序列，其特征在于：SDSECPLLCEVWILK。

4、一种权利要求 2 所述的中药有效成分的氨基酸序列获得方法所确定的具体氨基酸序列，其特征在于：SDSECPLLPRQGTGSLH。

5、一种权利要求 2 所述的中药有效成分的氨基酸序列获得方法所确定的具体氨基酸序列，其特征在于：IDCECPLLEAKCPSFPLWPQGREERQ。

6、一种权利要求 2 所述的中药有效成分的氨基酸序列获得方法所确定的具体氨基酸序列，其特征在于：SDSECPLLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC。

说明书

一种中药有效成分的氨基酸序列获得方法 及其所确定的具体氨基酸序列

所述技术领域：

本发明涉及一种中药有效成分的氨基酸序列获得方法及其所确定的具体氨基酸序列。

背景技术：

中药有效成分的研究仍然是中药现代化领域一个前提性的关键问题。经过长期的努力，我们已初步阐明了数百种常用中草药的主要成分和大量主药效成分的基本药理作用。但是，整体来说，对中药有效成分的研究是很不全面的。例如，在已发现的中药化学成分中，有很多与其临床药效没有对应关系。中药有效成分的研究在基础理论和研究手段上都亟待提高，而且必须引入新思路、新技术。在基因技术如此成熟的今天，蛋白质/肽类部分应该作为中药有效成分研究的重点之一。

长期以来，由于技术手段的限制，以往对中药有效成分的研究大多集中在采用化学或物理方法对中药的有机化学成分（如黄酮类、甾醇类、甙类等）进行分析及合成，而非针对蛋白质/多肽等生物大分子进行研究。蛋白质/多肽是执行生命功能的重要成员，对中药开

展肽类活性物质及其基因的研究，将直接获得治疗用药或药物先导物。

研究表明，麝香中含蛋白质约 25%，麝香肽的分子结构未见报道。目前可进行人工合成的是麝香酮、麝香吡啶类、C₁₉甾体类等化学成分。

“六五”、“七五”期间，我国组织了对天然麝香化学成分谱以及重组人工麝香的重点攻关研究，由于技术方法与研究手段的限制，尽管我国学者当时已从天然麝香分离获得一分子量约 5000-6000、含 15 种氨基酸的麝香多肽，并证明其对巴豆油引起小鼠耳部炎症的抑制作用是氢化可的松的 36 倍（以 mg/kg 相比较）或 500 倍以上（以摩尔浓度相比较），是麝香发挥药效不可缺少的成分。但在申报新药时，未能合成麝香多肽，而是以其它产物（芳活素）替代。这也是人们仍然推崇天然麝香的原因之一。

根据麝香多肽具有比糖皮质激素强的药效作用数据推测：麝香多肽在免疫介导的组织损伤与疾病如过敏性哮喘、肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、结节性动脉炎、重症肌无力、糖尿病等疾病的治疗中可以发挥重要的作用。上述疾病目前在临床上仍依赖糖皮质激素的应用，并由此带来了许多甾体激素引起的毒副作用，使这类疾病的治疗较为困难。麝香多肽基因工程药物的开发具有广泛的临床应用价值和巨大的市场开发前景。

技术内容：

为了快速、高效、大量地获得传统中药的有效成分，本发明提供一种中药有效成分的氨基酸序列获得方法，其特征在于：将含有中药有效成分的功能活性部位的活性多肽或蛋白质进行分离纯化，得到有药用价值的活性多肽；利用药效学分析方法确证其药效后，进行氨基酸序列测定；然后，从动植物的功能活性部位或组织中制备 cDNA 文库，从中获取编码活性肽的目的基因；从而得到活性多肽的氨基酸序列。上述的分离纯化是指采用蛋白质分离纯化技术（包括亲和层析、疏水层析等各种层析技术、以及凝胶电泳、高效液相色谱、质谱等方法），提取中药有效成分的功能活性部位的多肽或蛋白质。然后，通过常规的药理学实验对所得多肽或蛋白质进行药效学分析，以确定获得具有药用价值的活性多肽/蛋白，进行氨基酸序列分析。制备 cDNA 文库是指：采集动植物含有有效成分的组织，提取细胞中的 mRNA 或总 RNA，然后利用 RT-PCR 方法获得 cDNA，将全部的 cDNA 片段克隆到表达载体上，含有不同 cDNA 片段的所有克隆的集合就称为 cDNA 文库，即理论上，该文库含有细胞中全部的基因片段。利用 PCR 技术从 cDNA 文库或直接从 mRNA 中获得编码中药多肽/蛋白的基因，将该基因进行序列分析，确证所得基因序列无误后，推导出氨基酸序列。一方面可委托专业的多肽合成公司进行化学合成，另一方面，可将所获得的基因序列克隆到原核或真核表达载体上，构建重组质粒，转化宿主细胞，筛选工程菌，通过工程菌发酵培养和提取纯化得到重组活性多肽或蛋白。工程菌是大肠杆菌、酵母或动物培养细胞（包括哺乳类细胞）。本发明可以

在大肠杆菌、酵母或动物培养细胞（包括哺乳类细胞）表达系统中表达麝香多肽基因，通过各种筛选标记获得工程菌；就工程菌而言，可从重组蛋白或多肽的表达水平及表达产物的活性等方面确定生产用的工程菌（种子菌），进行发酵培养，利用蛋白质分离纯化技术将表达产物提取出来，进行药物开发的临床前研究等工作。

中药有效成份的基因是麝香多肽的编码基因。麝香为鹿科动物林麝（*Moschus berezovskii* Flerov）脐下腺分泌物的干燥品，自古为中医常用的贵重药材，应用于防病治病已有两千多年的历史。我国最早的医药典籍《神农本草经》将麝香列为上品，历代医术均有收载。具有开窍醒神、活血通经、消肿止痛之功，剂量少，疗效确切，常用于昏迷、疼痛、炎肿等急症。我国近年来在人工麝香的研制及其药理作用的研究等方面虽然取得了可喜的进展，但主要集中在麝香酮等化学成分的人工合成上，对于麝香中的重要活性物质——麝香多肽及其基因的研究则尚未涉足。选择它作为药用基因进行化学方法的多肽合成或基因工程生产，一方面可突破上述采用芳香活素作替代所造成的局限，另一方面可进行一系列中药基因资源的保护和开发。

上述中药的有效成分的氨基酸序列获得方法所确定的具体氨基酸序列之一是：SDSECPLLCEVWILK。

上述中药的有效成分的氨基酸序列获得方法所确定的具体氨基酸序列之一是：SDSECPLLPRQGTGSLH。

上述中药的有效成分的氨基酸序列获得方法所确定的具体氨基酸序列之一是：IDCECPLLEAKCPSFPLWPQGREERQ。

上述中药的有效成分的氨基酸序列获得方法所确定的具体氨基酸序列之一是：SDSECPLLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC。

附图说明：

图 1、本发明的一种麝香多肽的色谱分析洗脱图谱

图 2、从图 1 中分离的一个单一条带

图 3、合成多肽 SDSECPLLCEVWILK 的质谱分析图

图 4、合成多肽 SDSECPLLPRQGTGSLH 的质谱分析图

图 5、合成多肽 IDCECPLLEAKCPSFPLWPQGREERQ 的质谱分析图

图 6、合成多肽 SDSECPLLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC 的质谱分析图

实施方案：

实施例一：（见图 1-6）

麝香活性多肽的合成及药效学研究

为了首先确定目标物，本发明将天然麝香的水溶性部分进行分离纯化以及药效学分析。

1. 色谱分析（见图 1）与凝胶电泳分析（见图 2）

天然麝香经有机溶剂 95%乙醇等抽提后，溶于无菌水，制成分析用样品，样品离心后取上清液，用 0.22 μ m 滤膜过滤。进行 Tricine

SDS-PAGE 电泳，电泳结果采用银染方法检测。根据所得结果可以大致了解天然麝香中所含蛋白质或肽类的分子量，以此确定后续的实验方案。本次实验确定对分子量 6000-8000 的部分进行色谱分析，色谱柱为 Superdex Peptide HR 10/30 (Pharmacia)，用 ddH₂O 平衡 2 柱床体积，取 200 μ l 样品上柱，用 ddH₂O 洗脱 1.5 柱床体积，流速为 0.5ml/min。分别接收各洗脱峰，共获得 4 个洗脱峰（见图 1），即初步表明，在该分子量范围有 4 个组分，对 4 个组分分别进行药效学实验，确定具有药效的组分后，进行电泳，将所获得的单一条带（见图 2。1, 2: 分离样品；M: 蛋白分子量标准）进行氨基酸序列测定。

2. HPLC 分析

对预期的洗脱峰成分进行高压液相色谱（HPLC）分析，进一步确定其中的组分是否为单一成分，若非单一成分，则可利用该法进行进一步分离纯化，所得单一成分可直接用于氨基酸序列测定，也可根据需要，进一步作质谱分析。

3. 质谱分析和氨基酸序列测定

采用质谱分析技术，对所得单一成分进行检测，可获得氨基酸组成及序列数据，借助进一步的氨基酸序列测定，可确定末端的或全部的氨基酸序列，由此可以推导出编码基因的序列，用于化学合成或基因工程生产。

4. 基因序列的获得

由上述方法推导的基因序列，由于密码子的兼并性，可以有多种可能的序列，对此可采用以下两种途径解决：

(A) 根据所选择的表达系统,根据该系统中宿主细胞的密码子偏好性设计目的基因的序列,然后进行人工合成,经过序列测定,确定所合成的序列无误。

(B)根据推导的基因序列,合成引物,利用 PCR 方法获得天然麝香蛋白或多肽的编码基因:首先,采集林麝脐下腺,提取其中的 mRNA,进行 RT-PCR,所得 cDNA 可用于制备 cDNA 文库或直接利用 PCR 方法获得目的基因序列。

5. 氨基酸序列的获得

由上述基因序列推导出一定数量的氨基酸序列,利用生物信息技术,结合药效学资料确定候选序列,委托美联(西安)生物科技有限公司进行化学合成,合成产物必须进行质谱分析,以确定合成质量(见图 3-6)。合成的多肽序列如下:

SDSECPLLCEVWILK

SDSECPLLPRQGTGSLH

IDCECPLLEAKCPSFPLWPQGREERQ

SDSECPLLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC

6. 麝香活性多肽的药效学实验

采用常规的小鼠耳部炎症模型,研究上述 4 个多肽的抗炎活性,结果表明,上述合成多肽对小鼠耳部炎症的抑制作用均有显著性的效果。

说明书附图

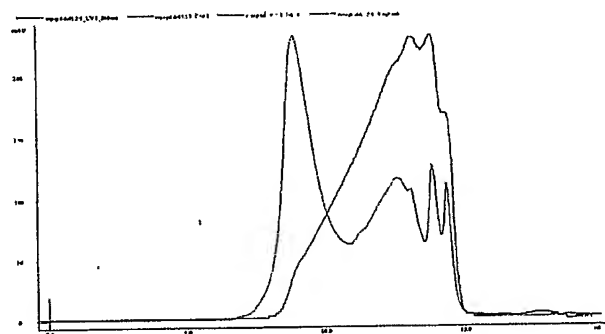


图 1.

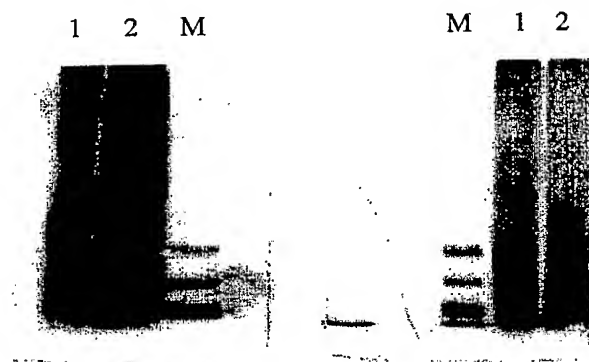
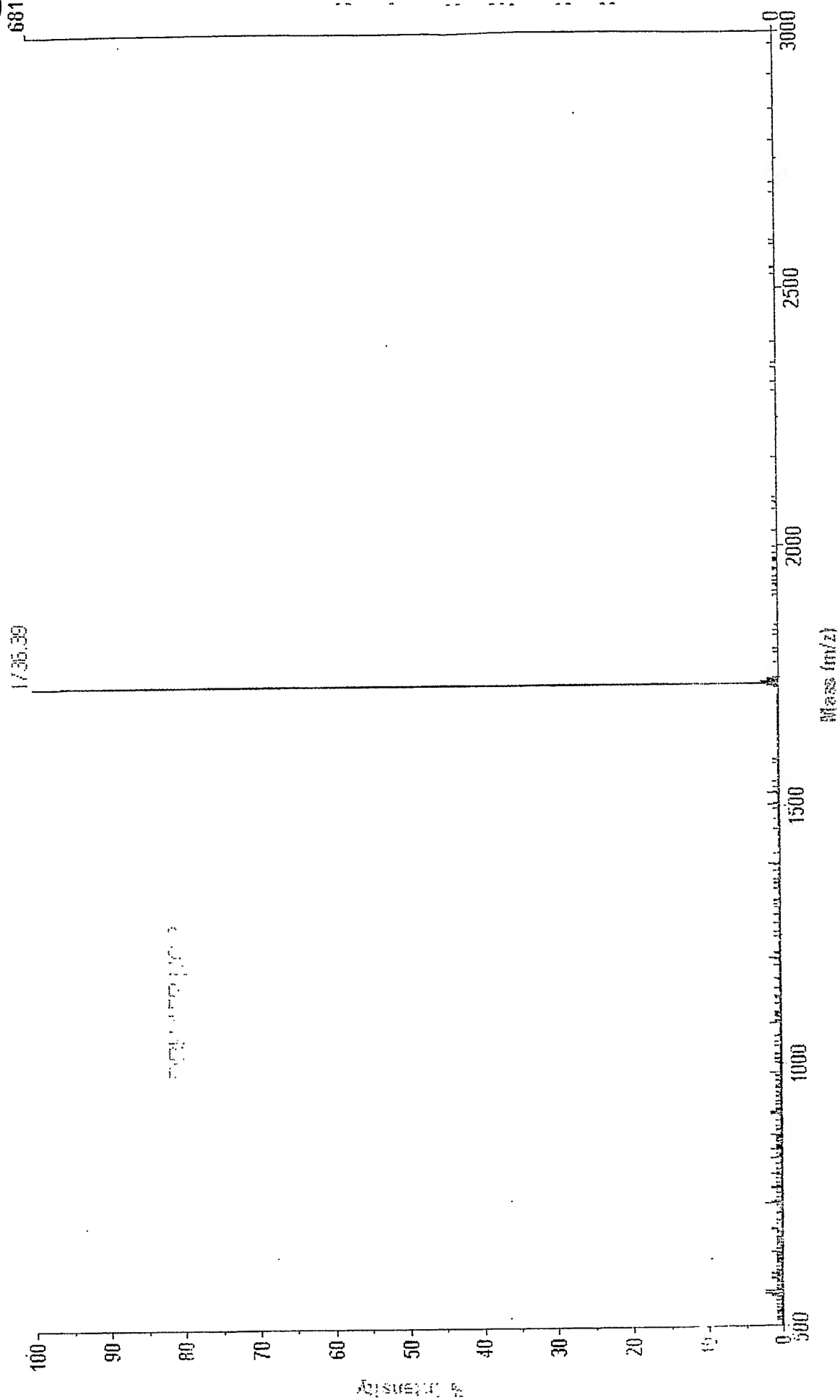


图 2.

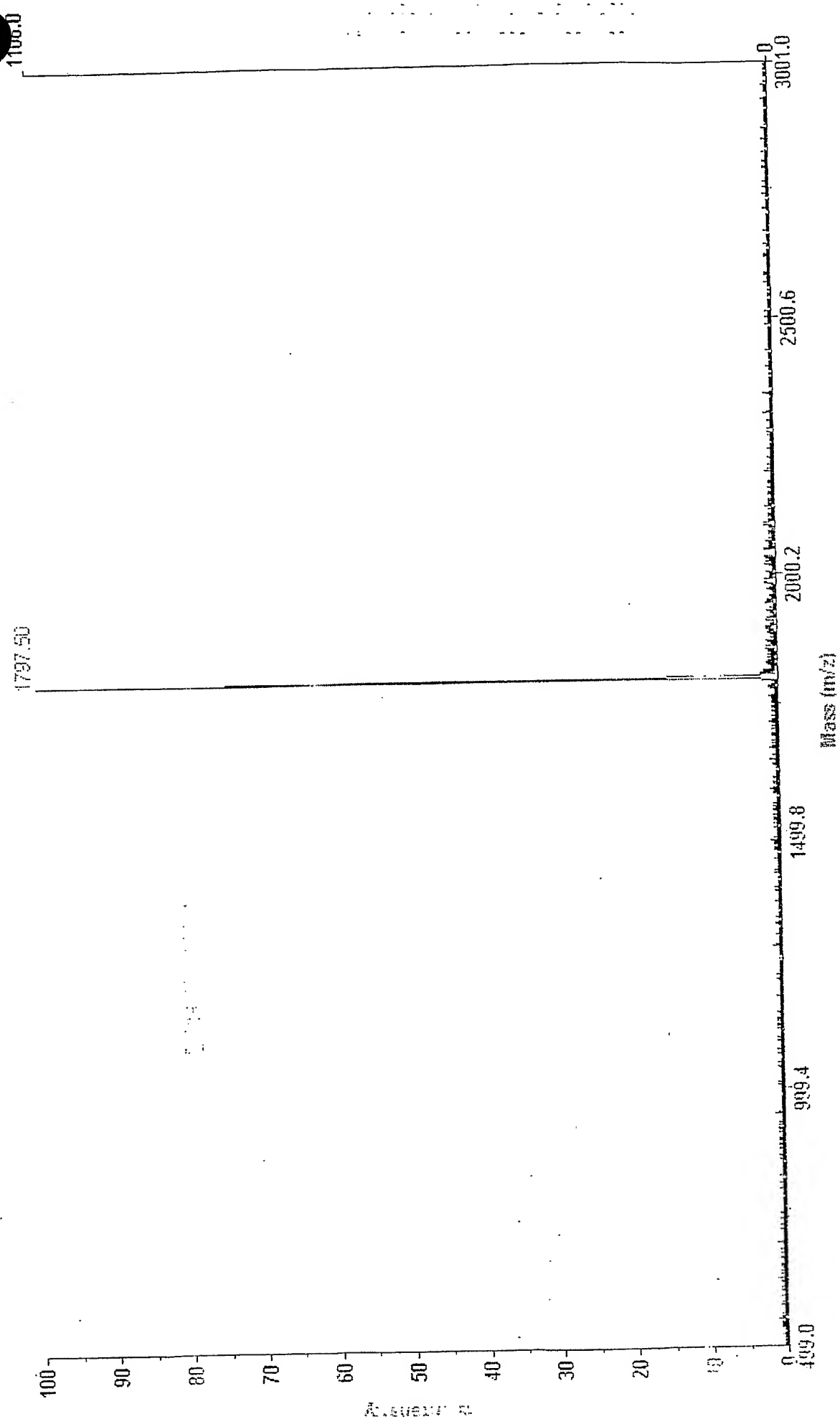
Voyager Spec #1[BP = 1736.1, 681]



图三

70

Voyager Spec #1[BP = 1797.4, 1106]

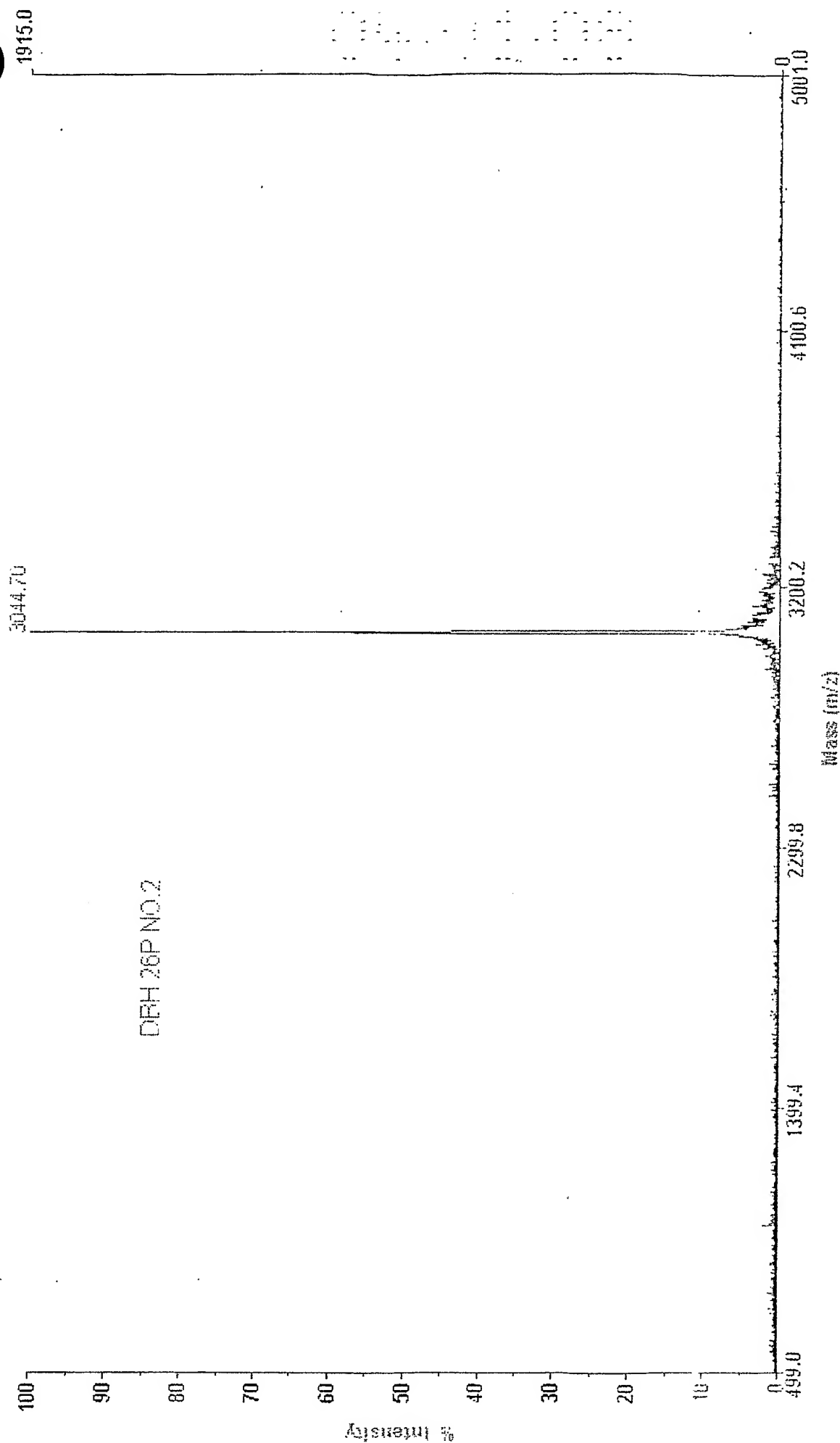


图四

15

Voyager Spec #1 [BP = 3043.9, 1915]

DRH 26P NO.2

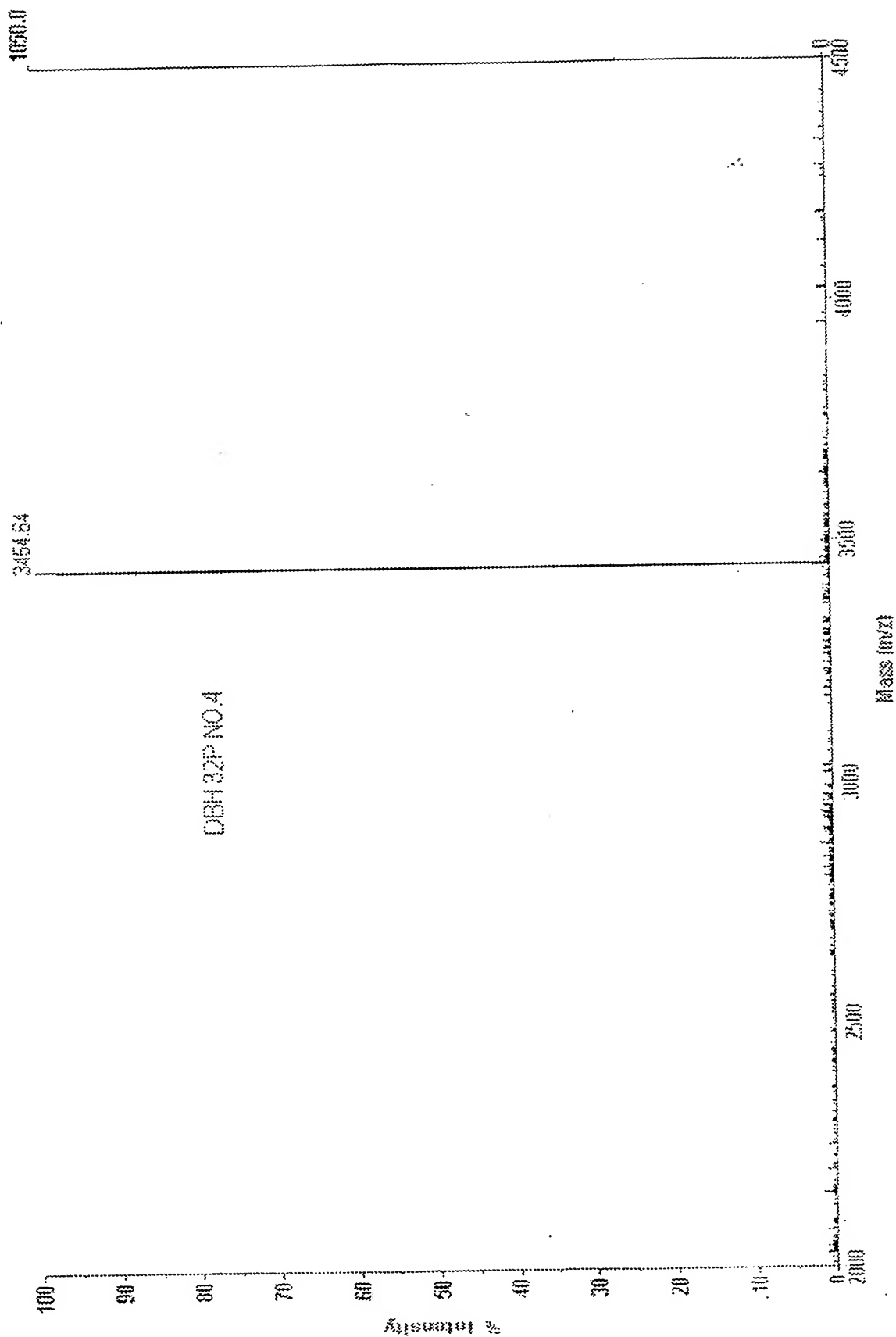


图五

16

Voyager Spec #1[EP = 3454.0, 1050]

DBH 32P NO.4



图六